

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
14 de Junio de 2001 (14.06.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 01/42426 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 1/15,
15/80, C07K 14/385, C12P 37/00, C12R 1/66, 1/82

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES00/00464

(22) Fecha de presentación internacional:
7 de Diciembre de 2000 (07.12.2000)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9902706 10 de Diciembre de 1999 (10.12.1999) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid
(ES). **UNIVERSITY OF SHEFFIELD** [GB/GB]; 85
Wilkinson Street, Sheffield, South Yorkshire S10 26J
(GB). **IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE AND
MEDICINE** [GB/GB]; Hammersmith Hospital-Du Cane
Road, Londres, Greater London W12 ONN (GB).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **SUÁREZ
GONZALEZ, Teresa** [ES/ES]; Ctro. De Investigaciones
Biológicas, Consejo Superior De Investigaciones Cientí-
ficas, Velázquez, 144, E-28006 Madrid (ES). **TURNER,
Geoffrey** [GB/GB]; University of Sheffield, 85 Wilkin-
son Street, Sheffield, South Yorkshire S10 26J (GB).
ARST, Herbert [GB/GB]; Imperial College of Science

and Medicine, Hammersmith Hospital-Du Cane Road,
Londres, Greater London W12 ONN (GB). **PEÑALVA
SOTO, Miguel Angel** [ES/ES]; Ctro. De Investigaciones
Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Cientí-
ficas, Velázquez, 144, E-28006 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **OJEDA GARCÍA, Pedro**; Consejo Supe-
rior de Investigaciones Científicas, Serrano, 113, E-28006
Madrid (ES).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publicada:

— Con informe de búsqueda internacional.

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: **PENICILLIN PRODUCTION USING TRANSGENIC MERODIPLOID STRAINS**

(54) Título: **PRODUCCION DE PENICILINA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE CEPAS TRANSGENICAS MERODIPLOI-
DES**

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining a *Penicillium chrysogenum* transgenic merodiploid strain in which
the activity of the regulating gene controlling the biosynthesis of penicillin has been altered in a targeted manner. Hence, said strain
is a hyperproductive strain of penicillin. This is the first time in which the biosynthesis of an industrially important metabolite has
been increased by manipulation of a regulating gene and thereby represents an outstanding novelty in comparison with previously
used technologies.

(57) Resumen: El objeto de la presente invención es un procedimiento de obtención de una cepa merodiploide transgénica de *Pe-
nicillium chrysogenum* en la que se ha alterado de manera dirigida la actividad de un gen regulador que controla la biosíntesis de
penicilina por lo que esta cepa es hiperproductora de penicilina. Esta invención representa el primer caso en el que la biosíntesis de
un metabolito de interés industrial ha sido incrementada por manipulación de un gen regulador, y por lo tanto presenta una notable
novedad sobre las tecnologías previamente utilizadas.



WO 01/42426 A1

TÍTULO:

PRODUCCIÓN DE PENICILINA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE CEPAS TRANSGÉNICAS MERODIPLOIDES.

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

Biotecnología. Ingeniería genética de microorganismos.

Síntesis de antibióticos. Penicilina

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

Tanto *Penicillium chrysogenum* como el hongo filogenéticamente relacionado *Aspergillus nidulans* sintetizan benzilpenicilina (penicilina G) a partir de los mismos precursores aminoacídicos y de fenilacetato. Hasta el presente, se ha conseguido mejorar la producción de penicilina por ingeniería genética en estos hongos mediante, por ejemplo:

- (i) un incremento en la expresión de uno o más de los tres genes estructurales responsables de convertir los precursores aminoacídicos y fenilacetil-CoA en penicilina G [Peñalva, M.A et al. (1998) The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. *Trends in Biotechnology* 16: 483-489],
- 20 (ii) la interrupción (en *A. nidulans*) de la ruta de catabolismo de fenilacetato y su consiguiente canalización hacia la biosíntesis de penicilina [Mingot, J. M. et al. (1999) Disruption of *phacA*, an *Aspergillus nidulans* gene encoding a novel cytochrome P450 monooxygenase catalyzing phenylacetate 2-hydroxylation, results in penicillin overproduction. *J Biol Chem* 274:14545-25 14550; también Patente española P97700833],
- (iii) la sobreexpresión (en *P. chrysogenum*) de una fenilacetil-CoA ligasa de origen bacteriano [Minambres, B. et al. (1996). Molecular cloning and expression in different microbes of the DNA encoding *Pseudomonas putida* U phenylacetyl-CoA ligase - Use of this gene to improve the rate of 30 benzylpenicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J Biol Chem* 271:33531-33538; también Patente P9600664], y

- (iv) la canalización del precursor ácido α -aminoadípico hacia la biosíntesis de penicilina por interrupción de la biosíntesis de lisina a partir de dicho precursor [Casqueiro, J. et al. (1999) Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. *J Bacteriol.* 181:1181-1188].

Todas estas estrategias se basan en la ganancia de función (mediante sobreexpresión) o en la inactivación de genes estructurales implicados en la biosíntesis de precursores de penicilina considerados individualmente. Esta invención cubre una posibilidad alternativa que no había sido previamente explorada, que es la manipulación por ingeniería genética de un gen regulador para incrementar simultáneamente la función de varios genes estructurales bajo su control. La ventaja es que es de aplicación general a otros metabolitos secundarios y no requiere la identificación previa de los genes estructurales cuya expresión se modifica en el organismo receptor.

- En *A. nidulans* [Espeso, E. A. et al. (1993) pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* 12:3947-3956] y *P. chrysogenum* [Suárez T. y Peñalva M.A. (1996) Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol.Microbiol.* 20:529-540], la ruta de biosíntesis de penicilina está regulada positivamente por la proteína con dedos de zinc PacC (Tilburn, J. et al (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14:779-790]. En *A. nidulans*, PacC se sintetiza en forma inactiva (674 residuos aminoácidos) y es activada mediante eliminación proteolítica de unos 400 aminoácidos en su región carboxilo-terminal. La proteína resultante (aproximadamente 250 residuos) es un activador transcripcional de los genes de biosíntesis de penicilina [Tilburn, J. et al. (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14: 779-790; Orejas, M. et al. (1995) Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of

the carboxy-terminal moiety. *Gene Develop.* 9:1622-1632]. Este procesamiento proteolítico se produce en respuesta a una señal que se transmite cuando el medio ambiente es alcalino.

En *A. nidulans* mutaciones (denominadas *pacC^c*) en el gen *pacC* que
5 producen un truncamiento en la región carboxilo terminal de la proteína entre los aminoácidos 263 y 574 (considerando el codon ATG en posición 5 de la ORF como punto principal de iniciación de traducción) causan la activación proteolítica independiente de pH ambiental de la proteína, mimetizan condiciones ambientales alcalinas y resultan en ganancia de función génica
10 *pacC*, con lo que, cualquiera que sea el pH del medio, se produce una expresión elevada de los genes que deben funcionar a pH alcalino y una expresión reducida de aquellos que deben funcionar a pH ácido. Los genes "alcalinos", cuya expresión se ve incrementada en este fondo genético, incluyen genes de la ruta de biosíntesis de penicilina.

15 En *A. nidulans*, las mutaciones *pacC^c* se comportan como codominantes en diploides heterozigóticos con un alelo silvestre *pacC⁺*. Se desconoce el comportamiento de estas mutaciones en estirpes merodiploides con dos copias del gen *pacC* (una de ellas *pacC^c* y la segunda *pacC⁺*) y el resto del genoma en su condición normal haploide.

20 En el organismo industrial *Penicillium chrysogenum* existe un homólogo del gen *pacC* de *A. nidulans* [Suárez T. y Peñalva M.A. (1996) Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol. Microbiol.* 20: 529-540]. Dicho gen (que
25 denominaremos Pc-*pacC*) posiblemente regula de manera positiva la ruta biosintética de penicilina G, con lo que un incremento en la función pudiera resultar en un incremento en los niveles de producción de este antibiótico. Pc-*pacC* (GenBank ID U44726) codifica para un factor de transcripción (Pc-PacC) que tiene aproximadamente un 64% de identidad de secuencia de aminoácidos
30 con su homólogo de *A. nidulans*. La secuencia de 641 aminoácidos deducida para Pc-PacC se muestra en SEQ. ID NO 1.

La tecnología de ingeniería genética está muy poco desarrollada en el organismo industrial *Penicillium chrysogenum* en relación con el organismo modelo *A. nidulans*. Por ejemplo, se ha demostrado que la inactivación génica por recombinación homóloga con alelos nulos de un gen es muy ineficiente

5 [Peñalva, M.A. et al. (1998) The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. *Trends in Biotechnology* 16: 483-489].

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10 Breve descripción

El objeto de la presente invención es el diseño por ingeniería genética de una cepa merodiploide transgénica de *Penicillium chrysogenum* en la que se ha alterado de manera dirigida la actividad de un gen regulador que controla la biosíntesis de penicilina. Esta invención representa el primer caso en el que la

15 biosíntesis de penicilina ha sido mejorada por manipulación de un gen regulador, y por lo tanto presenta una notable novedad sobre las tecnologías previamente utilizadas.

Para evitar las dificultades tecnológicas antes mencionadas, en la presente invención se propone la generación de estirpes merodiploides que

20 contienen, además de la copia silvestre del gen *pacC*, una o más copias adicionales de una versión mutante del gen *pacC* que codifica para una proteína truncada en el aminoácido 477. Todas estas cepas merodiploides son notablemente superproductoras de penicilina con relación a la estirpe materna y muestran niveles elevados de transcripción de al menos dos genes de la

25 biosíntesis del antibiótico, demostrando así la validez del abordaje seguido.

Descripción detallada de la invención

Se han construido una serie de cepas merodiploides derivadas de *P. chrysogenum* NRRL1951. El gen *pacC* silvestre de esta estirpe codifica una

30 proteína de 641 aminoácidos cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO 1. Además del gen *pacC* silvestre, estas cepas transgénicas contienen una o varias copias de *pacC33*, una variante alélica de *pacC* de 481 residuos que

codifica para una proteína PacC normal hasta su residuo 477 tras el que se añaden, debido a un cambio de pauta de lectura resultante del truncamiento, cuatro aminoácidos anormales, con los que termina en su extremo carboxilo terminal (ver SEQ ID NO 3). La secuencia de nucleótidos de cDNA que
5 codifica esta proteína truncada se presenta en la SEQ ID NO 2). El gen *pacC* de *P. chrysogenum* tiene un intrón a partir del nucleótido 223 de 56 pb [no se incluye en SEQ ID NO 2; Suárez T. y Peñalva M.A. (1996) Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic
10 cluster. *Mol.Microbiol.* 20: 529-540]. Esta proteína truncada está diseñada para que proporcione ganancia de función PacC, por analogía a la situación en *A. nidulans*, independientemente de la presencia o ausencia de la señal transducida por la ruta de genes *pal*.

15 **Selección de una cepa receptora de *P. chrysogenum* y de marcadores de transformación**

El marcador de transformación utilizado para la construcción de varias de las estirpes transgénicas fue el gen *sC*, que codifica para el enzima ATP-sulfurilasa, que convierte el sulfato en adenosina 5'-fosfosulfato. Esta
20 conversión es un paso esencial para la utilización de sulfato inorgánico como única fuente de azufre por *P. chrysogenum* y otros hongos, por lo que los mutantes *sC* son incapaces de crecer en medio con sulfato como fuente de azufre, aunque lo hacen normalmente en medio suplementado con fuentes de azufre orgánico, como L- o D-metionina. La selección de los transformantes en
25 un fondo genético *sC* se realiza por su capacidad de crecer en medio con sulfato, que les diferencia de la estirpe parental *sC*.

El selenato (SeO_4^{2-}) que penetra en las células a través de la permeasa del sulfato, es un compuesto tóxico para los hongos. Por ejemplo, inhibe el crecimiento de *P. chrysogenum* NRRL1951 a concentración 10 mM, permitiendo el aislamiento de mutantes resistentes, que pueden tener
30 mutaciones de pérdida de función en el gen *sB* (que codifica para la permeasa de sulfato y selenato) o en el gen *sC*. Estas dos clases mutantes se distinguen,

por ejemplo, porque los mutantes *sB* pueden crecer utilizando sulfato de colina como única fuente de azufre, mientras que los mutantes *sC* no lo hacen. Por ello, en la cepa receptora se seleccionaron mutantes resistentes espontáneamente al selenato. Una vez aislados y purificados los clones
5 mutantes, se analizó su capacidad de crecimiento en diferentes compuestos como fuente de azufre para diagnosticar el gen inactivado en cada caso por la mutación que confería resistencia a selenato [H. N. Arst, Jr.(1968) Genetic analysis of the final steps of sulphate metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Nature* 219:268-270].

10 De esta manera se identificaron varios mutantes presumiblemente afectados en el gen *sC*. Se calculó la frecuencia de reversión de cinco de estos mutantes y se seleccionaron dos de ellos que revertían con una frecuencia menor a 2×10^{-7} . El gen funcional *sC* de *P. chrysogenum* presente en el plásmido pINES1 (Figura 1A) complementó las respectivas mutaciones
15 presentes en estas estirpes, lo que sirvió para verificar que ambas eran mutantes *sC*. De ellas se seleccionó aquélla que presentó una frecuencia de transformación más alta (45 transformantes por μg de pINES1). El alelo *sC* mutante de esta estirpe se denominó *sC14*. Esta estirpe (*sC14*), que se usó como receptora de transformación, ha sido depositada en la CECT con el
20 número 20327.

También se utilizó como marcador en la transformación un gen quimérico en el que el gen bacteriano *ble* de resistencia a fleomicina (antibiótico al que *P. chrysogenum* es sensible) se expresa bajo el control de
25 secuencias promotoras de la transcripción procedentes del promotor *gpdA* de *A. nidulans* y del terminador del gen *CYC1* de *Saccharomyces cerevisiae*. La utilización de este gen quimérico, que se comporta como un marcador dominante para la selección de transformantes en *P. chrysogenum* ha sido descrita por Kolar [Kolar, M. et al. (1988) Transformation of *Penicillium chrysogenum*, using dominant selection markers and expression of an
30 *Escherichia coli lacZ* fusion gene. *Gene* 62:127-134]. Experimentos previos (ver Ejemplos) permitieron establecer que una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ de

fleomicina era la óptima para la selección de transformantes en la cepa silvestre NRRL1951.

Preparación de los plásmidos transformantes, transformación y 5 selección de las cepas transgénicas

Un gen *Pc-pacC* mutante (SEQ ID NO 2) que codifica para una proteína truncada de 481 aminoácidos (SEQ ID NO 3) se introdujo en los vectores pPhleo y pPcsC para dar lugar a los plásmidos recombinantes pPacC33(Phleo) y pPacC33(sC), respectivamente (Fig. 1B y C). Este alelo *Pc-pacC* mutante se
10 denominó *pacC33* y lleva corriente arriba del ATG iniciador de traducción, 1550 pb de la región promotora del gen *Pc-pacC*. El promotor del gen *Pc-pacC* es un promotor débil [Suárez T. y Peñalva M.A. (1996) Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic
15 cluster. *Mol.Microbiol.* 20:529-540]. Como control se construyó el plásmido pPacC(sC), que se diferencia de pPacC33(sC) en que lleva el un alelo *Pc-pacC*⁺ en lugar de *pacC33* (ver Figura 1D, mapa de los plásmidos).

Los plásmidos se introdujeron por transformación en *P. chrysogenum* NRRL1951 (pPacC33(Phleo)) o en su estirpe derivada mutante sC14
20 (pPacC33(sC) y pPacC(sC)). Tras la selección y purificación de los transformantes y el análisis de la situación y número de copias del plásmido integradas en el genoma mediante la técnica de Southern, se seleccionaron los siguientes transformantes que se han depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): **TX5** (CECT 20328) es una estirpe de *P. chrysogenum*
25 con 3 copias de pPacC33(Phleo) integradas en tándem en una posición indeterminada del genoma. **TSC4** (CECT 20329) es una estirpe de *P. chrysogenum* con una única copia de pPacC33(sC) integrada en el locus sC. **TSC7** (CECT 20330) es una estirpe de *P. chrysogenum* con una sola copia de pPacC33(sC) integrada en el locus *pacC*. **TSC03** (CECT 20331) es una estirpe
30 de *P. chrysogenum* con una sola copia de pPacC(sC) integrada en el locus *pacC*. Todas estas estirpes son morfológicamente indistinguibles de la cepa silvestre NRRL1951.

Resultado de la aplicación de esta tecnología

Las estirpes merodiploides **TX5**, **TSC4** y **TSC7** son hiperproductoras de penicilina G, en comparación con la estirpe NRRL1951 y con su cepa mutante NRRL1951 sC14 receptora de los transgenes, con las que no mostraron
5 diferencias de crecimiento o de variación del pH del medio de cultivo. La producción de penicilina y tasa de crecimiento de las cepas sC14 y su parental NRRL1951 fue muy similar, mostrando que la mutación sC14 no afecta la producción del antibiótico (Figura 2). Utilizando sacarosa como fuente de carbono (que normalmente reprime la producción de penicilina G) las estirpes
10 merodiploides alcanzaron, por ejemplo, niveles al menos 5 veces superiores a los obtenidos de la cepa sC14 (ver descripción detallada y Figura 3). La estirpe **TSC03** (con dos copias del gen *pacC* silvestre), también es hiperproductora de penicilina con respecto a la cepa sC14, aunque en mucha menor medida que, por ejemplo, la cepa **TSC7** con una copia del gen silvestre y una segunda copia
15 del alelo *pacC33* (Figura 4). Estos resultados validan los principios utilizados en esta invención de (i) diseñar estirpes transgénicas con función *pacC* incrementada con objeto de sobreproducir penicilina y (ii) diseñar mutaciones de *pacC* que proporcionen ganancia de función y que se comporten como co-dominantes en merodiploides con una copia del gen *pacC* silvestre.

20 Las cepas **TX5**, **TSC4** y **TSC7** son también sobreproductoras de penicilina en medio con lactosa, donde los niveles de producción son aproximadamente el doble de los obtenidos con sC14 o NRRL 1951 (Figura 5).

El RNA de los distintos transformantes en diferentes días de los cultivos de producción de penicilina G se analizó por la técnica de northern con sondas
25 específicas para los genes estructurales *pcbAB*, que codifica para la ACV sintetasa, y *pcbC*, que codifica para la IPNS sintetasa, de la ruta de biosíntesis de penicilina. La cuantificación con Phosphorimager de las señales de hibridación de las membranas, permitió determinar los perfiles de transcripción de estos genes en la cepa receptora sC14 cultivada en condiciones de inóculo
30 y agitación controladas. En esta cepa, los transcritos de estos genes se detectaron a partir del día 3, con un nivel máximo en los días 5-6 tras la siembra. Como ejemplo, la cepa transgénica **TSC7** mostró reproduciblemente,

un aumento de aproximadamente dos veces en el nivel máximo de transcripción de estos dos genes con respecto a la cepa sC14 (Fig. 6).

En conclusión, la presente invención describe un nuevo procedimiento que permite incrementar la síntesis de penicilina mediante la manipulación genética de un gen regulador, *pacC*. Se presenta por primera vez una forma mutada de este gen en *P. chrysogenum*, denominada *pacC33*, que codifica una proteína con ganancia de función y cuya secuencia (SEQ ID NO 2) forma parte de la presente invención.

Esta información permite desarrollar otras formas mutadas, completas o parciales, tanto por síntesis de nuevas secuencias de ADN como por aislamiento e identificación de formas naturales, de genes homólogos en otros ascomicetos, que codifiquen nuevas proteínas con ganancia de función respecto a la proteína salvaje PacC, y forman parte de la presente invención.

El uso de promotores, para la expresión de estas formas mutadas, diferentes del propio promotor del gen *pacC*, bien sean promotores condicionales o constitutivos, es una variante evidente de esta invención y forma parte de ella.

Estos resultados demuestran que cepas transgénicas merodiploides para el gen *pacC* de *P. chrysogenum* que tienen un alelo silvestre y otro mutante de *pacC*, modificado de manera dirigida, son cepas sobreproductoras de penicilina y tienen niveles elevados de los transcritos de al menos dos genes implicados en la biosíntesis de penicilina.

El gen regulador *pacC* controla la síntesis de otros metabolitos secundarios y de numerosas enzimas extracelulares. El uso de esta tecnología para la construcción de estirpes transgénicas de *P. chrysogenum* utilizando la estrategia aquí descrita (o variantes de ella) para modificar en sentido positivo o negativo la función *pacC* con el objeto de incrementar la síntesis de metabolitos y enzimas extracelulares de utilidad o de prevenir la de metabolitos indeseables, como las aflatoxinas, queda cubierta por esta solicitud.

La transferencia de la tecnología descrita en esta solicitud a otros hongos de interés industrial como, por ejemplo, *Aspergillus niger* o *Thricoderma reesei* es evidente y queda cubierta por esta solicitud.

La transferencia de esta tecnología a otros genes reguladores de ascomicetos con objeto de incrementar la síntesis de metabolitos y enzimas extracelulares de utilidad o de prevenir la de metabolitos indeseables queda asimismo cubierta por esta solicitud.

5

EJEMPLOS

Ejemplo 1.-Obtención de cepas mutantes en el gen que codifica la ATP-sulfurilasa.

La cepa silvestre de *P. chrysogenum* NRRL1951 se obtuvo del CBS
10 (Holanda). Con el objeto de seleccionar mutantes resistentes al selenato, se
plaquearon $1,5 \times 10^8$ esporas de esta cepa en 30 placas de medio mínimo
[Cove, D. J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the
fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim.Biophys.Acta* 113:51-56] con 10 mM de
selenato sódico y 10 µg/ml de D-metionina y 1% de glucosa y 10 mM de
15 tartrato amónico, como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente. Los
mutantes resistentes al selenato aparecieron con una frecuencia de $1,5 \times 10^{-7}$
esporas. Una vez purificados, el fenotipo de los mutantes se comprobó
mediante tests de crecimiento.

Los mutantes resistentes al selenato pueden mapear, al menos, en dos
20 genes estructurales, *sC* (ATP-sulfurilasa) y *sB* (permeasa de sulfato). Los
mutantes en el gen *sC* no crecen en un medio con sulfato de colina como
fuente de S, compuesto que sí es capaz de suplementar la deficiencia en la
permeasa, ya que entra en la célula por una permeasa alternativa a la del
sulfato/selenato. De esta manera se identificaron 7 mutantes *sC* putativos. Con
25 el objeto de verificar cuáles de ellos eran definitivamente mutantes *sC*, se
procedió a probar mediante transformación con el plásmido pINES1 (Fig. 1A) si
las mutaciones eran complementables por el gen *sC* funcional de *P.*
chrysogenum, mediante selección de los transformantes en medio con sulfato
como única fuente de S. Tras estos experimentos se seleccionó el mutante,
30 *sC14*, ya que presentó la más alta frecuencia de transformación con pINES1
(45 transformantes capaces de utilizar sulfato /µg de plásmido).

Ej mpl 2.- D terminación de la nsibilidad d *P. chrys genum* NRRL 1951 a la fleomicina.

Con el objeto de determinar la sensibilidad a fleomicina de la cepa NRRL1951, se realizaron experimentos con protoplastos en placas de medio de regeneración, en las condiciones de selección de los transformantes. Los protoplastos se obtuvieron tras incubar micelio crecido durante 20 h a 25°C en medio mínimo (Cove, 1966), con 30 mg de Novozyma por gramo de micelio (peso escurrido) durante 2 h a 25° en una solución 0.9 M KCl, 10 mM tampón fosfato pH 5,8. Los protoplastos se agitaron brevemente en el vórtex, y se centrifugaron a 3000g, de tal modo que los protoplastos sedimentaron encima del micelio no digerido, del que se distinguen por su color blanquecino. 10⁵ protoplastos viables de NRRL1951 se extendieron en placas de medio de regeneración de protoplastos (medio mínimo de Cove estabilizado osmóticamente con 1M sorbitol y 0,1 M sacarosa) que contenían 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 40 y 50 µg/ml de fleomicina (Cayla, Francia). A concentraciones superiores a 0,5 µg/ml no se observó crecimiento de colonias después de 10 días de incubación a 25°. Por ello se ha utilizado rutinariamente la concentración de 1 µg/ml de fleomicina en los experimentos de transformación en los que se ha usado la selección basada en este antibiótico.

20 Ejemplo 3.-Plásmidos utilizados en la transformación de NRRL 1951

El plásmido pINES1 (Figura 1A), de donde se obtuvo el gen *sC* de *P. chrysogenum*, es un derivado de pBR322 que incluye un fragmento *EcoRI-EcoRV* de 1,5 kb con el gen *pyr4* de *Neurospora crassa* y un fragmento de 6,1 kb *EcoRV-SalI* de DNA genómico de *P. chrysogenum* que contiene el gen *sC*. Se construyeron diferentes plásmidos que llevan un alelo silvestre o un alelo mutante *pacC33* del gen *pacC* de *P. chrysogenum*. La presencia de un sitio de corte de *KpnI* en una posición del gen de *P. chrysogenum* similar a aquella en la que se encuentra el triplete de terminación de traducción resultante de la mutación *pacC*¹⁴ en *A. nidulans* permitió crear una proteína truncada en el residuo 477, con 4 residuos adicionales en su carboxilo terminal antes de llegar a un codon de terminación de traducción (SEQ ID NO 2 y 3).

El plásmido pPacC33(Phleo) (Figura 1B) se construyó utilizando como base pBluescript II SK⁺. Este vector se digirió con *EcoRI* y *KpnI* y se le insertó mediante técnicas convencionales de ingeniería genética un fragmento *EcoRI*-*KpnI* de DNA genómico de *P. chrysogenum* NRRL 1951 de 3037 pb que incluye 1553 bp del promotor de *Pc-pacC* y la región de codificante de *Pc-pacC* hasta el codon 477 inclusive, para dar lugar al plásmido pPacC33. El alelo mutante resultante (denominado *pacC33*, SEQ ID NO 2) codifica para la proteína PacC truncada descrita en SEQ ID NO 3. En este plásmido se introdujo un gen quimérico consistente en el gen *ble* de *E. coli* bajo el control de señales promotoras y terminadoras fúngicas, que se obtuvo del plásmido pHS103 descrito por Kolar [Kolar, M. et al (1988) Transformation of *Penicillium chrysogenum* using dominant selection markers and expression of an *Escherichia coli lacZ* fusion gene. *Gene* 62:127-134] como un fragmento *EcoRI*-*HindIII* de 2,8 kb, cuyos extremos cohesivos se rellenaron con la DNA polimerasa de T4 para proceder a su inserción en el sitio único *BamHI*, convertido también en romo por el mismo método.

El plásmido pPacC33(sC) (Figura 1C), se construyó de manera análoga a pPacC33(Phleo), salvo que en este caso se insertó en el sitio *BamHI*, en lugar del gen de resistencia a fleomicina, un gen sC funcional, que se obtuvo de pINES como un fragmento *BglII* de 4,3 kb (Figura 1A). El plásmido pPacC(sC) (Figura 1D) es un derivado de pBS-SK⁺, en el que se introdujo en primer lugar un fragmento *EcoRI*-*Sall* de 7,5 kb, que contiene el alelo silvestre del gen *pacC* con el mismo fragmento del promotor presente en los plásmidos pPacC33(Phleo) y pPacC33(sC). Posteriormente, el fragmento de DNA que contiene el gen sC se introdujo de igual manera que en pPacC33(sC).

Ejemplo 4.-Transformación de la cepa NRRL1951 de *P. chrysogenum*

La transformación de *Penicillium* se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito para *A. nidulans* [Tilburn, J. et al. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26:205-211] con ligeras modificaciones. Los protoplastos se obtuvieron como se describe en el ejemplo 2. Los protoplastos se resuspendieron en STC (sorbitol 1 M, 10 mM Tris HCl pH 7,5, 10 mM CaCl₂), se lavaron dos veces en este tampón y se resuspendieron a una

concentración de $1-2 \times 10^7$ protoplastos en 200 μ l de STC. A cada alícuota se le añadieron 5 μ g de plásmido circular (en un volumen inferior a 20 μ l) y 20 μ l de PEG 6000 50% (v/v) en STC, y las mezclas se incubaron durante 20 min en hielo. Después se añadió 1 ml de PEG a cada tubo y se incubó durante 5 min a 25°, se añadió 1 ml de STC, se mezcló suavemente y se centrifugó 5 min a 12000 rpm. Los protoplastos se resuspendieron suavemente en 500 μ l de STC y se sedimentaron por centrifugación. Finalmente se resuspendieron en 200 μ l de STC, y se extendieron sobre placas de medio estabilizado osmóticamente (medio mínimo de Cove [Cove, D. J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim.Biophys.Acta* 113:51-56] con 0,1 M sacarosa y 1 M sorbitol), tras mezclarlos con 3 ml del mismo medio con un 0,25% (p/v) de agar. Para la selección basada en la resistencia a fleomicina, se incluyó el antibiótico en el medio de regeneración a una concentración de 1 μ g/ml. Para la selección basada en sC, se utilizó medio mínimo normal, que contiene sulfato como única fuente de azufre. Las placas se incubaron a 25°C. Las colonias capaces de crecer en los medios selectivos aparecieron a los 6-7 días y se purificaron en medio selectivo sin estabilizador mediante el aislamiento de colonias individuales crecidas a partir de conidiosporas.

20 Ejemplo 5.-Caracterización molecular de los transformantes

Los transformantes purificados se crecieron para obtener micelio, del que se extrajo el DNA siguiendo el método de Pérez-Esteban [Pérez Esteban, B. et al. (1993) Molecular characterization of a fungal secondary metabolism promoter: transcription of the *Aspergillus nidulans* isopenicillin N synthetase gene is modulated by upstream negative elements. *Mol.Microbiol.* 9:881-895]. Este DNA se digirió con las enzimas *EcoRI* o *XbaI* para determinar el número de copias del plásmido y su lugar de integración en el genoma. Los DNAs digeridos se cargaron en geles del 0,7% de agarosa para separar los fragmentos de restricción, que se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana se incubó 2 h a 80° para fijar el DNA. Posteriormente, se pre-hibridó durante 2 h a 42°, en 50% formamida, 5X solución de Denhart, 5X SSC y 0,1% de SDS con 50 μ g/ml de DNA

monocatenario de esperma de salmón sonicado, tras lo cual se añadieron 50 ng de la sonda correspondiente: bien el fragmento *EcoRI-HindIII* de 2,8 kb que contiene el gen *ble*, bien el fragmento *BglII* de 4,3 kb que contiene el gen *sC* o bien un fragmento *HindIII-KpnI* de 1,3 kb de DNA genómico de *P. chrysogenum* perteneciente al gen *pacC*, en todos los casos marcados radiactivamente. La hibridación se llevó a cabo durante 18 h a 42°. El lavado final de los filtros se realizó durante 15 min a 65°C en 0,2X SSC, 0,1% SDS. Los filtros se expusieron a película autorradiográfica o en Phosphorimager para la detección de la radiactividad.

Para el análisis de los transformantes se emplearon digestiones con *XbaI* (Figuras 7 y 8). La sonda del gen *pacC* reveló en la cepa silvestre sC14 una banda *XbaI* de 4 kb que se transforma en dos nuevas bandas de 6 y 8,3 kb en el transformante **TSC7** (en el que el plásmido PacC33(sC) está integrado en el locus *pacC*, Figuras 7A y 8A). La sonda del gen *sC* reveló en la cepa silvestre sC14 una banda de 7 kb que se convierte en dos bandas de 6,5 y 10,8 kb en el transformante **TSC4** (pPacC33(sC) integrado en el locus *sC*, Figuras 7B y 8B). El transformante **TX5**, obtenido con el plásmido pPacC33(Phleo), presenta, con la sonda del gen *pacC*, una banda de 4 kb, otra banda de 10-11 kb y otra banda de cerca de 9 kb (Figuras 7C y 8C). Esta última banda es 3 veces más intensa que la banda procedente del gen *pacC* residente y su movilidad se corresponde con el tamaño del plásmido, por lo que se consideró que el merodiploide **TX5** es un transformante con 3 copias integradas en tándem en una posición no determinada del genoma (Figura 8C). En un análisis similar, el transformante **TSC03** (Figuras 7D y 8D) presenta, con la sonda *pacC*, la misma banda *XbaI* de 4 kb que aparece en cepa sC14 y un nuevo fragmento de 8,3 kb (un fragmento interno del inserto *pacC* de ~ 2,2 kb y las secuencias del vector no se detectan en esta hibridación, ver Figura 8D).

Ejemplo 6.- Producción de penicilina en sacarosa como fuente de carbono

Los transformantes seleccionados, junto con las cepas control NRRL 1951 o su derivado sC14 se crecieron a 25°C con fuerte agitación en medio de producción de penicilina (medio de Cove suplementado con 2,5% (p/v) de sólidos de corn steep y 0,12% (p/v) de fenilacetato sódico, y 3% de sacarosa o

3% lactosa (ambas p/v) como principal fuente de carbono). En todos los casos se inoculó a partir de una suspensión de conidiosporas, a una concentración inicial de $1-2 \times 10^6$ esporas/ml, utilizándose matraces de 500 ml con 100 ml de medio. Se tomaron muestras de medio a diferentes tiempos después del
5 inóculo, en las que se midió la cantidad de penicilina producida utilizando un bioensayo con *Serratia marcescens*. Para ello, se excavaron pocillos de 1 cm de diámetro en Medio Antibiótico-1 (DIFCO) sólido que incluía una suspensión diluida de la bacteria (a una D.O⁶⁰⁰ de 0,0075). En estos pocillos se colocaron 100 µl de una dilución apropiada de los sobrenadantes. Las placas se
10 incubaron durante 20 h a 37°, tras lo cual se midió el halo de inhibición de crecimiento bacteriano y se calculó la cantidad de penicilina mediante comparación con los halos producidos por distintas diluciones de una solución estandard de penicilina G sódica.

La Figura 2 muestra que el nivel de producción de penicilina de la cepa
15 sC14 es muy similar al de la cepa NRRL 1951 de la que procede, indicando que la mutación no afecta la producción de antibiótico. En medio con sacarosa o lactosa como fuente principal de carbono, el crecimiento de las distintas estirpes fue muy similar en cuanto a medida de biomasa y evolución del pH extracelular. Sin embargo, las estirpes transgénicas **TX5**, **TSC4** y **TSC7**
20 reproduciblemente produjeron niveles sensiblemente más altos de penicilina que la estirpe parental sC14, tanto con sacarosa (Figura 3), como con lactosa (Figura 5). En el primer caso, el incremento de producción fue de 4-5 veces aproximadamente, mientras que, en lactosa, los niveles de producción fueron aproximadamente dos veces los obtenidos con sC14 o NRRL 1951 (Figura 5).
25 La estirpe merodiploide **TSC03** (con dos copias del gen *pacC* silvestre) tiene un crecimiento similar a sC14 (ver la evolución del pH extracelular en la figura 4A) y también es hiperproductora de penicilina con respecto a la cepa sC14 (Figura 4B), aunque en mucha menor medida que las cepas **TX5**, **TSC4** y **TSC7**, que tienen, además de una copia del gen silvestre, una o más copias del alelo
30 *pacC33* (ver Figura 4B para la comparación de los niveles de producción de penicilina de **TSC03** con los de **TSC7** en sacarosa).

Ejemplo 7.- Análisis transcriptual de los merodiploides

De cultivos de producción de penicilina, se cosecharon muestras de micelio a lo largo del tiempo (desde el día 2 al día 10). De estos micelios, se extrajo el RNA mediante el método de Lockington [Lockington, R. A. et al (1985)

5 Cloning and characterisation of the ethanol utilisation regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 33:137-149] y se cargaron 10 µg de cada muestra en geles de agarosa del 1,2% con un 18% de formaldehído en tampón MOPS (40 mM MOPS pH 7,2; 10 mM acetato sódico; 0,5 mM EDTA). Los RNAs se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, que se secaron a 80°C para fijar el

10 RNA. Estas membranas fueron hibridadas con sondas que permitían detectar los siguientes genes: *pacC* (fragmento interno *HindIII-KpnI* de 1,3 kb); *pcbC* (fragmento interno *NcoI-BamHI* de 0,9 kb); *pcbAB* (fragmento *EcoRI* de 2,4 kb) y el fragmento de 955 bp *NcoI-KpnI* del gen *actA* de *A. nidulans*, que codifica para la actina, y que se empleó como control de homogeneidad de carga entre

15 las distintas muestras. Las condiciones de hibridación fueron idénticas a las descritas en el ejemplo 5, salvo que la cantidad de sonda añadida fue de 100 ng. El lavado final se realizó en el mismo tampón, pero a 42°C. En todos los experimentos de northern se incluyó en el gel un carril con 10 µg de mRNA obtenido a partir de un micelio de la cepa sC14 crecida durante 39 h en medio

20 de producción de penicilina con 3% de lactosa. Todas las membranas de nitrocelulosa, después de los lavados, se expusieron durante 15-18 h a una pantalla de PhosphorImager, sensible a la emisión β del P^{32} . Dichas pantallas se leyeron posteriormente en un PhosphorImager (Molecular Dynamics) y se cuantificaron las señales de hibridación empleando el software ImageQuant de

25 la misma casa comercial. Además de hibridar las membranas con sondas que permiten revelar los transcritos problema, todas las membranas se hibridaron con una sonda que revela el mRNA de la actina. Las cuantificaciones de las bandas reveladas con las sondas *pcbC*, *pcbAB* y *pacC*, se normalizaron frente a la intensidad obtenida en la banda de la actina en cada carril. Todos estos

30 cocientes para un gen dado de una misma membrana se normalizaron al valor del carril común (muestra de RNA de micelio de la estirpe sC14 crecida en lactosa durante 39 h), con el objeto de poder comparar medidas de intensidad

de diferentes membranas. Estas medidas, con su desviación estándar, son las que aparecen en la figura 6, para los RNA mensajeros de *pcbAB* y *pcbC*.

FIGURAS

- 5 **Figura 1.- Mapas esquemáticos de restricción de los plásmidos empleados en la construcción de las cepas merodiploides de *P. chrysogenum*.** A) plásmido pINES; B) plásmido pPacC33(Phleo); C) plásmido pPacC33(sC); y D) plásmido pPacC(sC). Los diferentes genes están indicados con las siguientes tramas: negro, gen *pyr4* de *N. crassa*; caja vacía, región del
- 10 gen *sC* de *P. chrysogenum* (la flecha indica la posición aproximada del gen y la dirección de transcripción); caja rayada, gen de resistencia a fleomicina, con el gen *ble* de *E. coli* rayado vertical y el promotor y terminador de transcripción indicados con rayado inclinado; finalmente, la caja gris indica la región del gen *pacC* de *P. chrysogenum*, con la posición, tanto del alelo silvestre como del
- 15 mutante, indicada con una flecha.

- Figura 2.- Crecimiento y producción de penicilina de las cepas de *P. chrysogenum* NRRL1951 y sC14.** Se representan las medidas de producción de penicilina, pH y peso seco en cultivos de las cepas NRRL1951 y sC14 realizados en medio de producción de penicilina con 3% de sacarosa (A)
- 20 o lactosa (B), como principal fuente de carbono.

- Figura 3.- Crecimiento y producción de penicilina de las cepas transgénicas *pacC*⁺/*pacC33*.** Medidas de la producción de penicilina y la tasa de crecimiento (pH y peso seco) en cultivos de las estirpes transgénicas TX5, TSC4 y TSC7, merodiploides *pacC*⁺/*pacC33*, en comparación con la estirpe
- 25 parental sC14. Los cultivos se realizaron en medio de producción de penicilina con sacarosa como principal fuente de carbono.

- Figura 4.- Crecimiento y producción de penicilina de la cepa transgénica *pacC*⁺/*pacC*⁺.** Medida de la tasa de crecimiento (pH extracelular, A) y de la producción de penicilina (B) de la estirpe transgénica TSC03, merodiploide
- 30 *pacC*⁺/*pacC*⁺, en comparación con la estirpe parental sC14. Los cultivos se realizaron en medio de producción de penicilina con sacarosa como principal fuente de carbono. En el panel B, se observa también la diferencia en la

producción de penicilina entre el merodiploide *pacC⁺/pacC⁺* (TSC03) y un merodiploide *pacC⁺/pacC33* (TSC7).

- Figura 5.- Producción de penicilina en medio con lactosa.** Medida de la producción de penicilina en lactosa de las cepas merodiploides *pacC⁺/pacC33*, TSC4, TSC7 y TX5, en comparación con la estirpe parental sc14.

Figura 6.- Cuantificación de los niveles de mRNA de *pcbC* y *pcbAB* en las cepas sc14 y TSC7. Las medidas están expresadas en unidades arbitrarias (UA). En abscisas se indica el tiempo de cultivo. Los datos son media de tres experimentos y las barras de error indican la desviación estándar.

- 10 **Figura 7.- Análisis por el método de Southern de las cepas merodiploides de *P. chrysogenum*.** Las muestras de DNA de las distintas estirpes fueron digeridas con *XbaI*. La sonda utilizada fue un fragmento del gen *pacC* (A, C y D) o del gen *sC* (B). Las flechas señalan las bandas de hibridación obtenidas con los merodiploides y la estirpe receptora, según se indica en el texto.
- 15 **Figura 8.- Esquema gráfico de los sucesos de recombinación de los plásmidos.** La interpretación gráfica de las bandas reveladas en el southern de la figura 7, se representa aquí para las cepas sc14 (tipo silvestre), TSC7 (A), TSC4 (B), TX5 (C) y TSC03 (D). El genoma del hongo está indicado por la línea fina continua. La caja con rayas gruesas representa el gen *sC* (versiones silvestre o mutante, sc14) y la flecha blanca indica la dirección de transcripción. Los genes *pacC⁺* o *pacC^{C33}* están representados por una caja blanca con una flecha interna (que indica la dirección de transcripción). El gen de resistencia a fleomicina está indicado por una caja con rayas finas y las secuencias plasmídicas, por una línea continua gruesa. En el transformante
- 20
- 25 TX5 no es posible determinar el lugar del suceso de integración, y se indica la repetición de tres copias del plásmido transformante. Las líneas de cotas muestran los tamaños (en kb) de los fragmentos señalados en la hibridación de la Figura 7.

REIVINDICACIONES

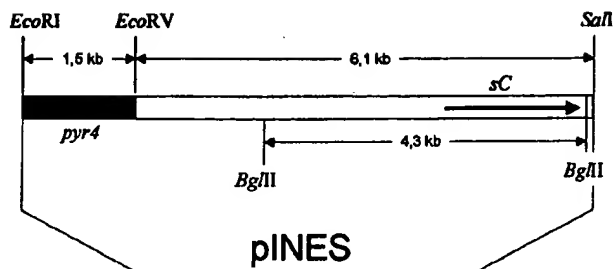
- 1.- Procedimiento de obtención de estirpes transgénicas de hongos filamentosos caracterizado porque:
- 5 a) las estirpes transgénicas son merodiploides para un gen regulador,
b) está basado en la transformación de dichas estirpes con un plásmido integrativo que incluye una secuencia de nucleótidos correspondiente a un alelo silvestre ó mutante dominante o codominante de dicho gen regulador, y porque
- 10 c) estas estirpes presentan nuevas capacidades de pérdida o ganancia de función en la producción de metabolitos o enzimas extracelulares.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque se produce una ganancia de función del gen regulador.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque se produce
- 15 una pérdida de función del gen regulador.
- 4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3 caracterizado porque se incrementa la producción de un metabolito secundario.
- 5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4 caracterizado porque el citado metabolito secundario es una penicilina o
- 20 cualquier otro antibiótico beta-lactámico producido por hongos filamentosos.
- 6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5 caracterizado porque la secuencia de nucleótidos puede ser una versión genómica o de ADNc del gen regulador, obtenida por síntesis o por selección.
- 7.- Una estirpe transgénica merodiploide obtenida por un procedimiento según
- 25 una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 6 donde el hongo filamentoso pertenece al grupo de ascomicetos de interés económico o médico, aunque sin limitarse a éstos, como son *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Thricoderma ressei* y *Candida albicans*.
- 8.- Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 caracterizada porque
- 30 representa un alelo del gen regulador *pacC* de *Penicillium chrysogenum* y codifica para una proteína mutante con ganancia de función.

- 9.- Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 caracterizada porque representa un alelo del gen regulador *pacC* de *Penicillium chrysogenum* y codifica para una proteína mutante con pérdida de función.
- 10.- Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 8 caracterizada porque
5 está constituida por la SEQ ID NO 2 y porque es el alelo *pacC33* del gen regulador *pacC*.
11. Secuencia de nucleótidos caracterizada porque presenta una identidad de al menos un 30% con la secuencia según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a la 10.
- 10 12.- Plásmido según la reivindicación 1 caracterizado porque contiene una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a la 11 y todos los elementos necesarios para promover la expresión del gen regulador correspondiente a dicha secuencia.
- 13.- Plásmido según la reivindicación 12 caracterizado porque el marcador
15 selectivo es el gen *sC* de *P. chrysogenum*.
- 14.- Plásmido según la reivindicación 12 caracterizado porque el marcador selectivo es el gen *sC* de otros *Penicillia*, *A. nidulans* y otros *Aspergilli* y otros ascomicetos filamentosos o levaduriformes.
15. Plásmido según la reivindicación 12 caracterizado porque presenta los
20 rasgos identificativos del plásmido pPacC33.
16. Plásmido según la reivindicación 12 caracterizado porque presenta los rasgos identificativos de pPacC33(*sC*).
17. Plásmido según la reivindicación 12 caracterizado porque presenta los rasgos identificativos de pPacC33(Phleo) de la presente invención.
- 25 18.- Plásmido según la reivindicación 12 caracterizado porque incluye una secuencia de nucleótidos que codifica para cualquier alelo de ganancia o pérdida de función del gen *pacC* de *P. chrysogenum*.
- 19.- Plásmido según la reivindicación 12 caracterizado porque incluye la
30 secuencia de nucleótidos que codifica para cualquier alelo de ganancia o pérdida de función del gen regulador *pacC* de otros *Penicillia*, otros *Aspergilli* y otros ascomicetos filamentosos o levaduriformes.

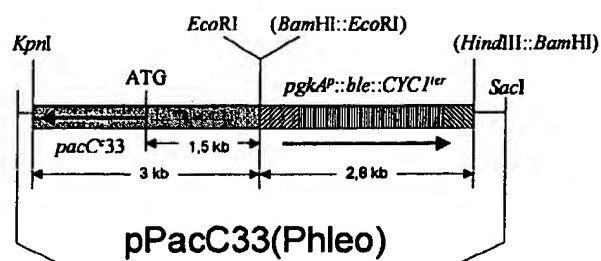
- 20.- Plásmido según la reivindicación 1 caracterizado porque contiene la secuencia de nucleótidos de la forma silvestre del gen regulador *pacC* de *P. chrysogenum*.
- 21.- Plásmido según la reivindicación 20 caracterizado por los rasgos
5 identificativos del plásmido pPacC(sC).
- 22.- Plásmido según la reivindicación 1 caracterizado porque contiene la secuencia de nucleótidos de la forma salvaje del gen regulador *pacC* de otros *Penicillia*, otros *Aspergilli* y otros ascomicetos filamentosos o levaduriformes.
- 23.- Estirpe transgénica merodiploide según la reivindicación 7 caracterizada
10 porque contiene un plásmido que incluye un alelo silvestre ó mutante del gen regulador *pacC*.
- 24.- Estirpe transgénica merodiploide según la reivindicación 23 caracterizada porque el alelo mutante del gen *pacC* es de ganancia de función.
- 25.- Estirpe transgénica merodiploide según la reivindicación 23 caracterizada
15 porque el alelo mutante del gen *pacC* es de pérdida de función.
- 26.- Estirpe merodiploide transgénica según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 23 a la 25 caracterizada por contener un plásmido según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a la 22.
- 27.- Estirpes merodiploides transgénicas según la reivindicación 26
20 caracterizadas porque presentan los rasgos identificativos de las cepas de *P. chrysogenum* registradas en la CECT con los números 20328, 20329, 20330, y 20331.
- 28.- Uso de las estirpes merodiploides transgénicas según la reivindicación 7 para la producción de metabolitos y proteínas extracelulares de interés
25 industrial.
- 29.- Uso de las estirpes transgénicas según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a la 27 para la producción de penicilina.

1/8

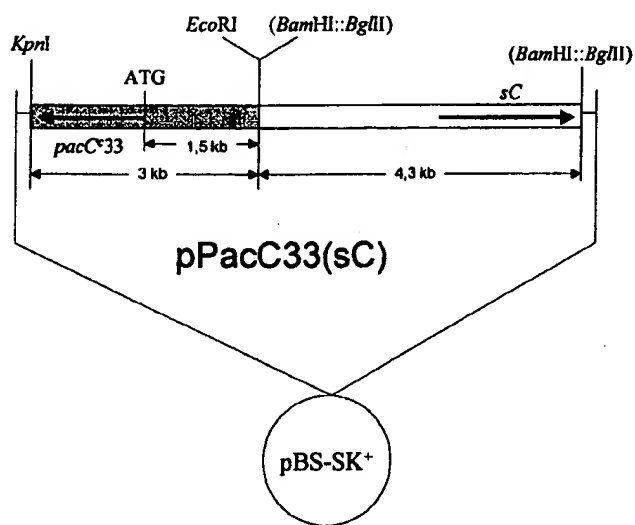
A



B



C



D

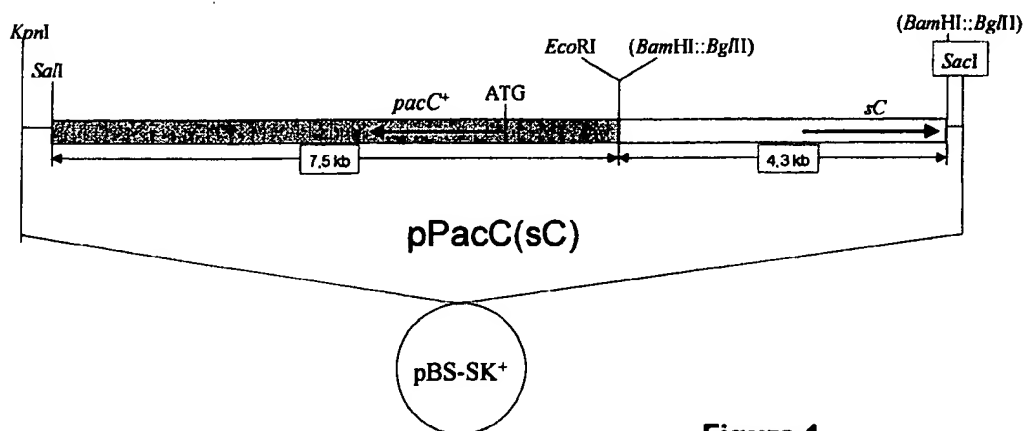


Figura 1

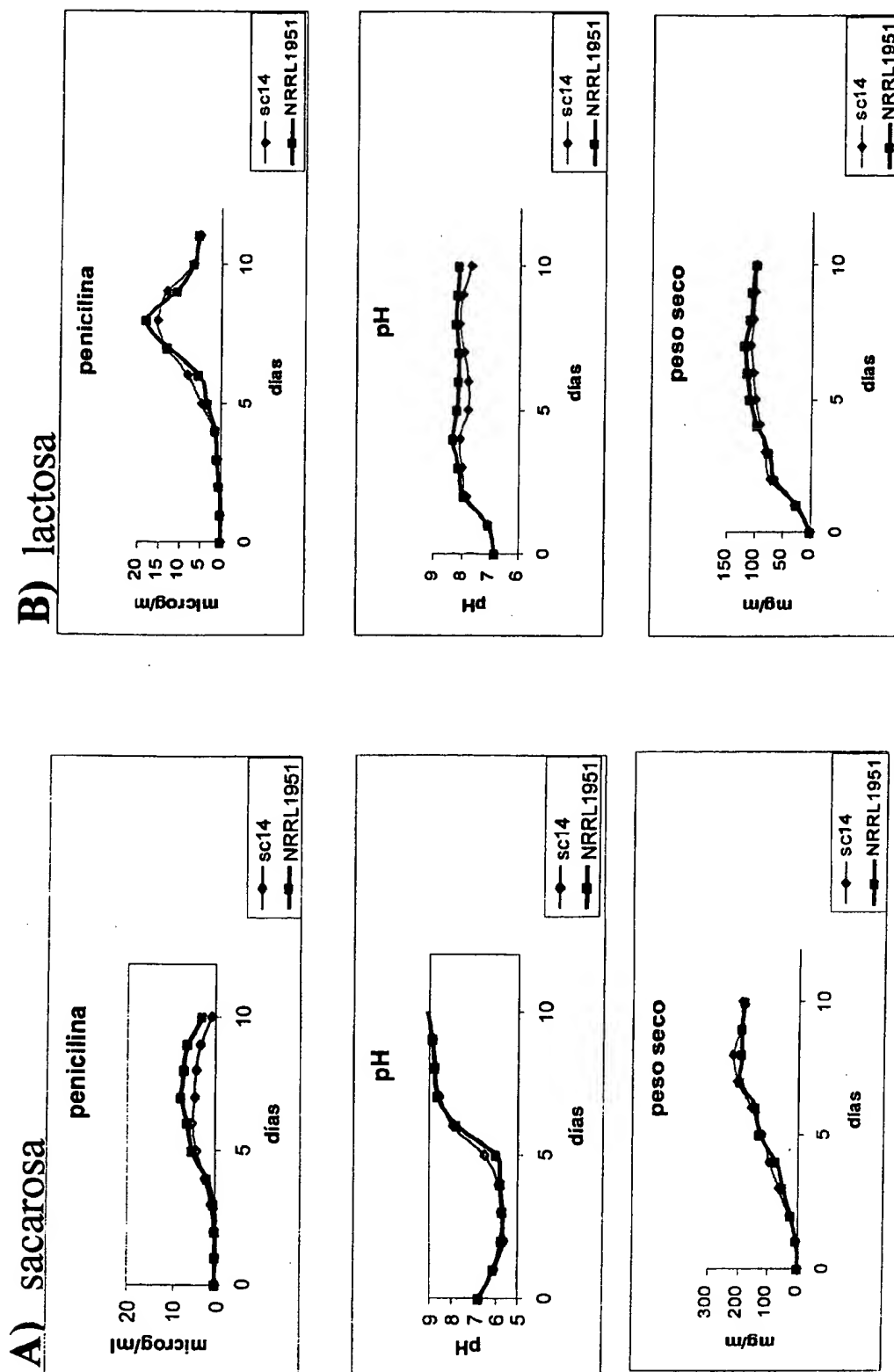
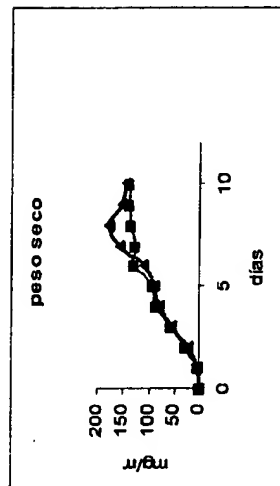
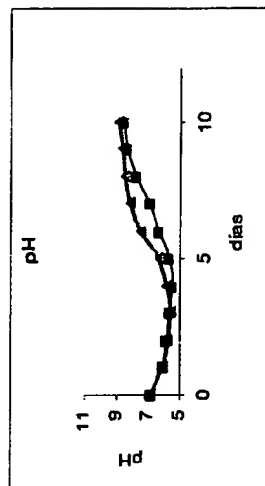
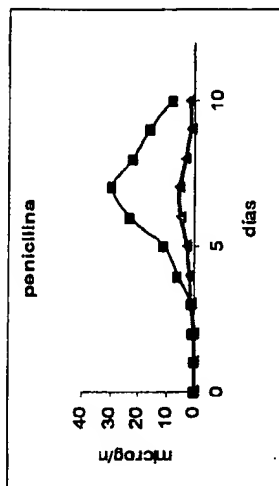
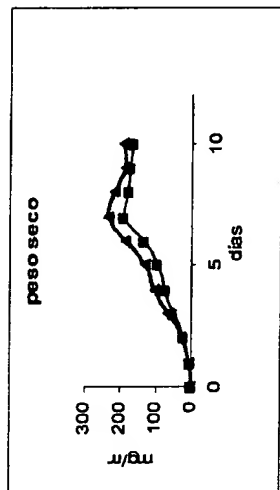
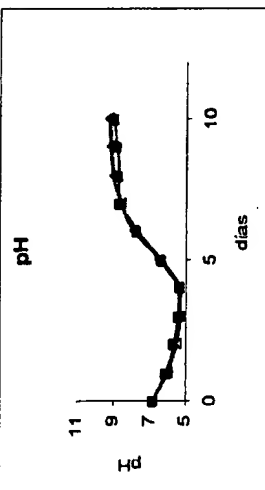
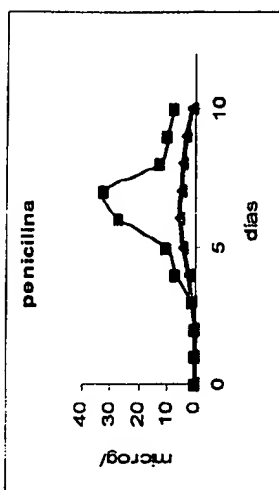


Figura 2

sc14(▲) y TSC7(■)



sc14(▲) y TSC4(■)



sc14(▲) y TX5 (■)

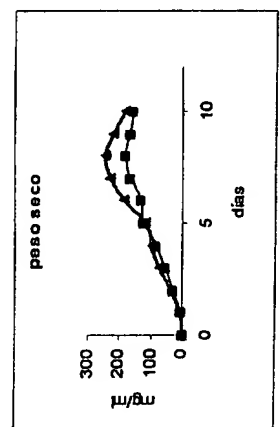
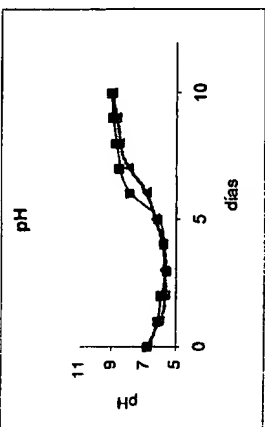
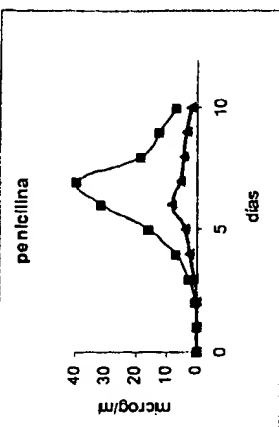


Figura 3

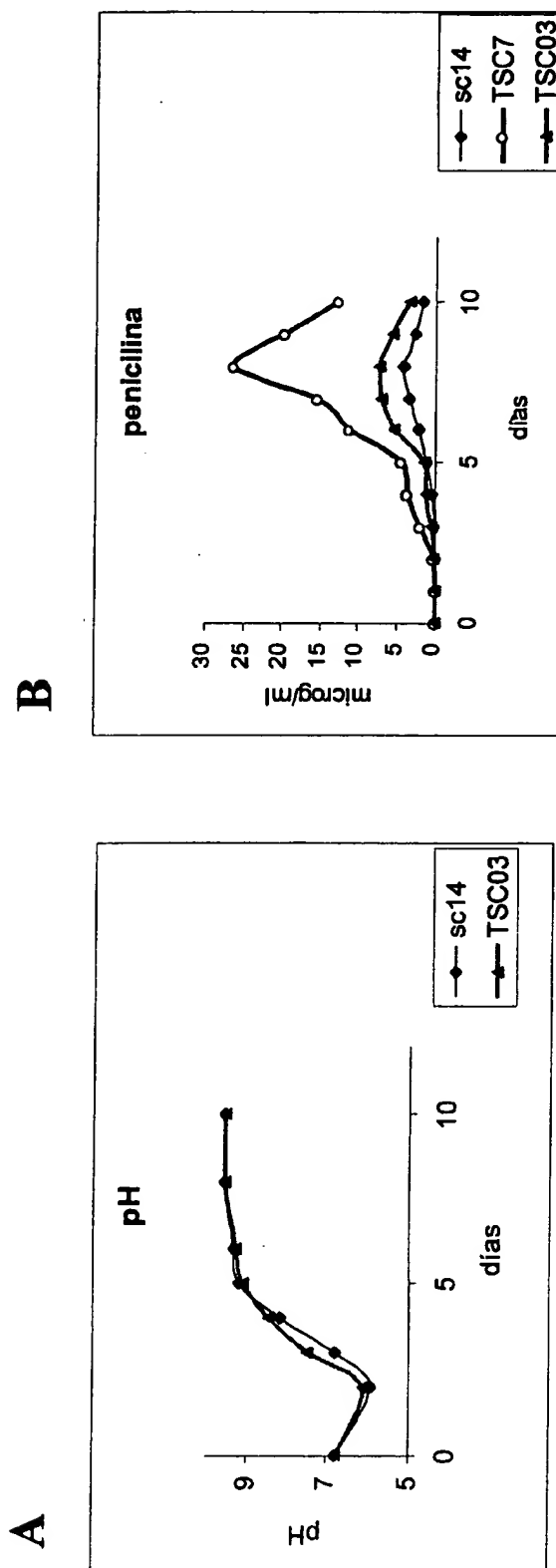


Figura 4

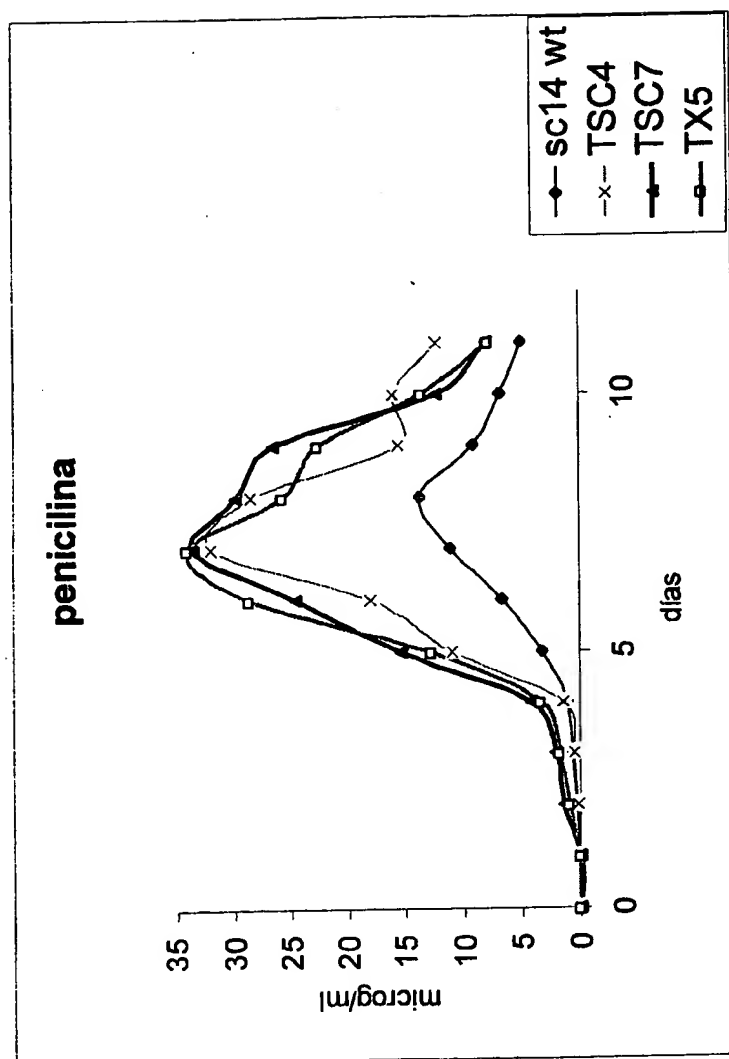


Figura 5

6/8

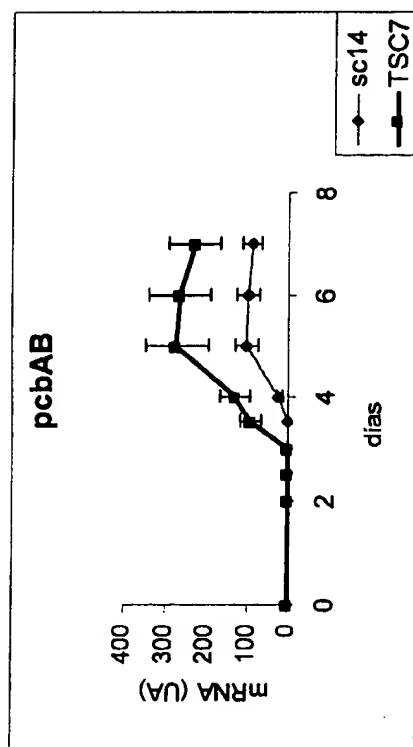
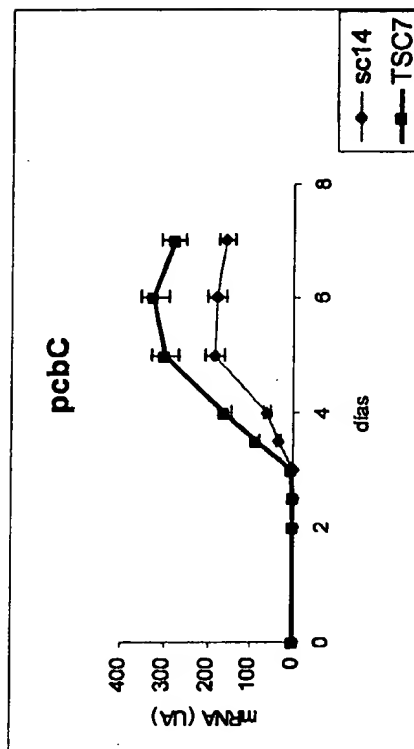


Figura 6

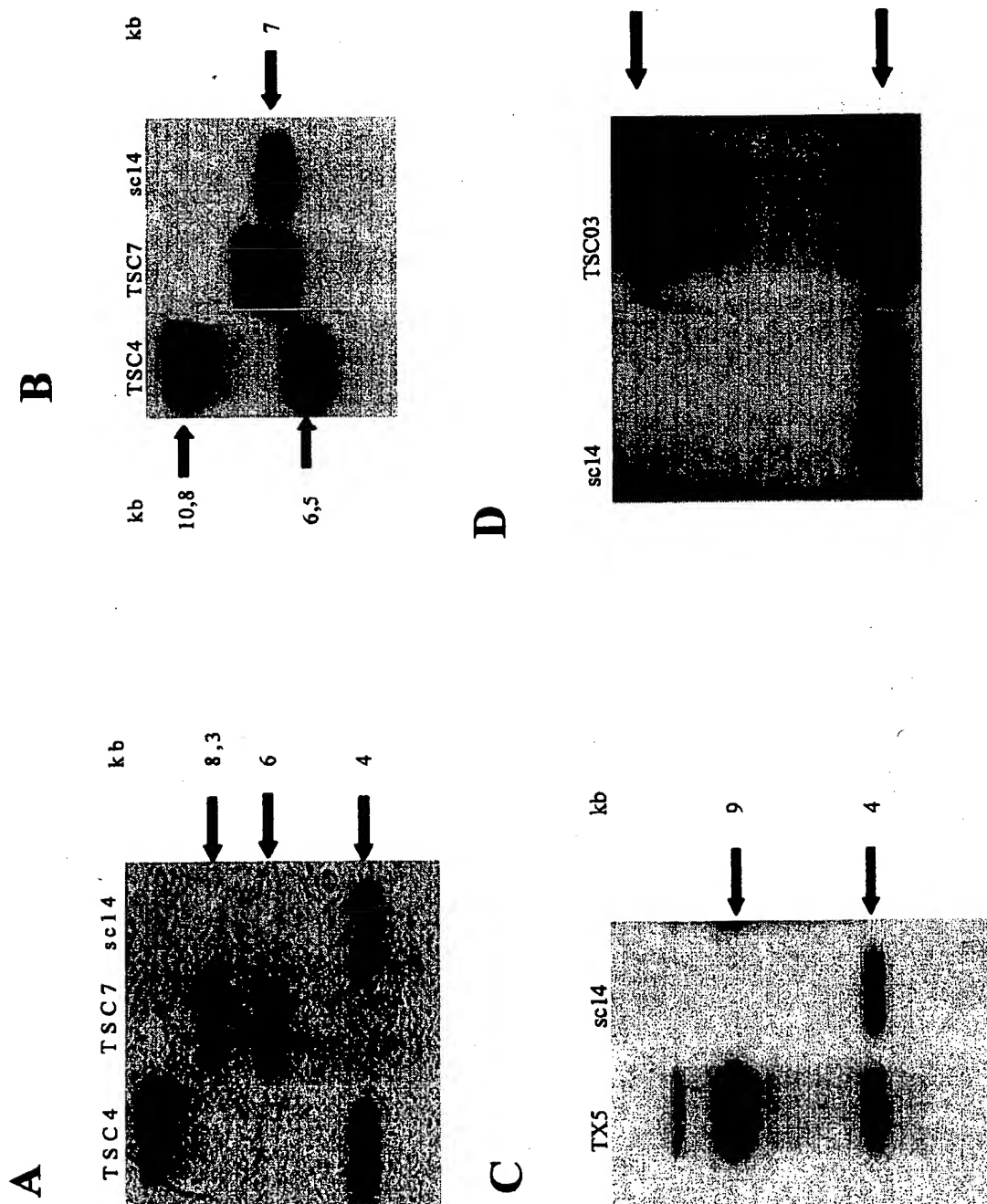


Figura 7

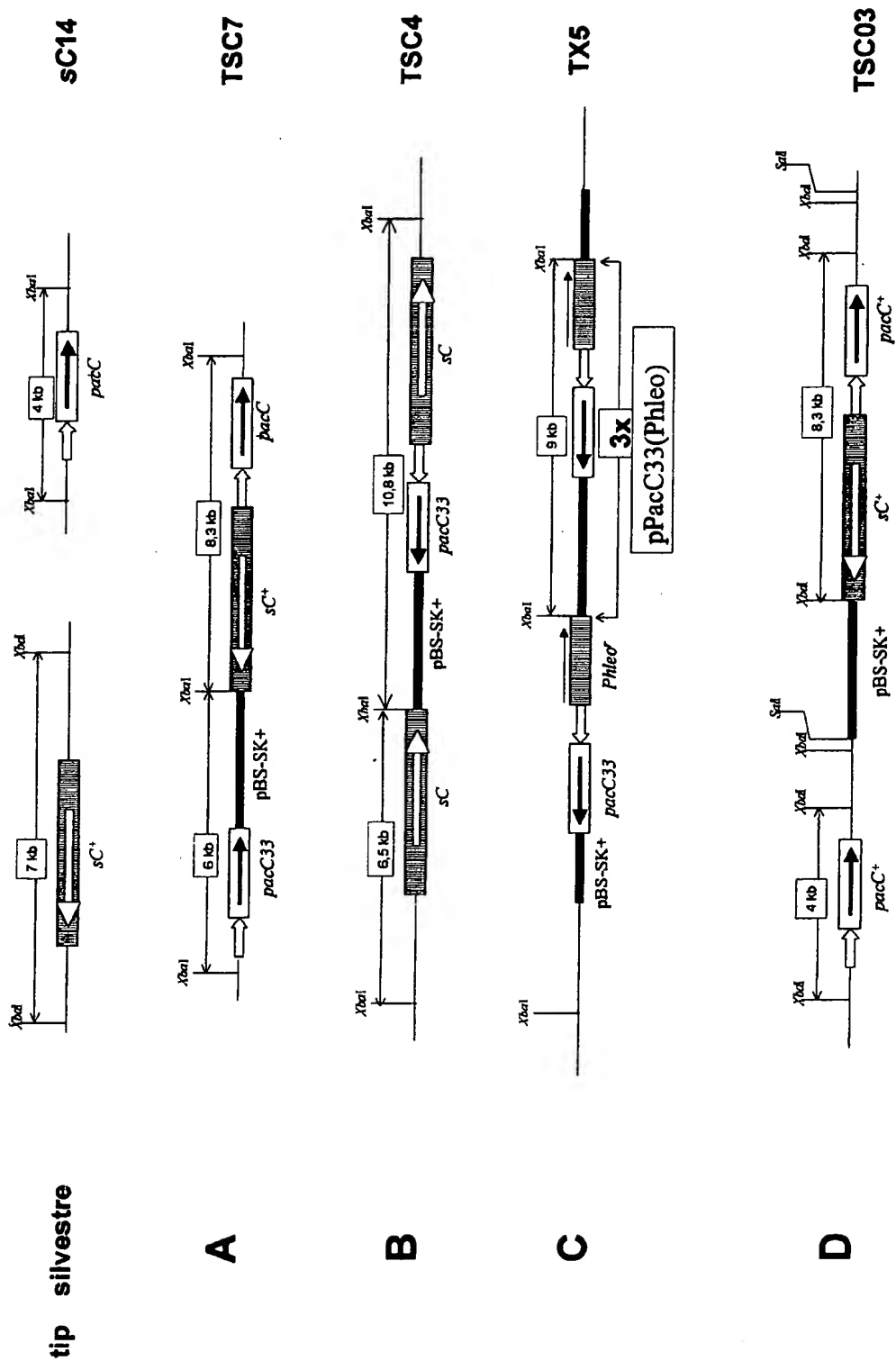


Figura 8

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> NUEVO GEN REGULADOR DE LA PRODUCCION DE PENICILINA

<130> Secuencia de PacC

<140>

10 <141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 641

<212> PRT

<213> Penicillium chrysogenum

20

<400> 1

Met Thr Glu Asn His Thr Pro Ser Thr Thr Gln Pro Thr Leu Pro Ala
 1 5 10 15

25 Pro Val Ala Glu Ala Ala Pro Ile Gln Ala Asn Pro Ala Pro Ser Ala
 20 25 30

Ser Val Thr Ala Thr Ala Ala Thr Ala Ala Val Asn Asn Ala Pro Ser
 35 40 45

30

Met Asn Gly Ala Gly Glu Gln Leu Pro Cys Gln Trp Val Gly Cys Thr
 50 55 60

Glu Lys Ser Pro Thr Ala Glu Ser Leu Tyr Glu His Val Cys Glu Arg
 35 65 70 75 80

2

His Val Gly Arg Lys Ser Thr Asn Asn Leu Asn Leu Thr Cys Gln Trp
 85 90 95

5 Gly Thr Cys Asn Thr Thr Thr Val Lys Arg Asp His Ile Thr Ser His
 100 105 110

Ile Arg Val His Val Pro Leu Lys Pro His Lys Cys Asp Phe Cys Gly
 115 120 125

10 Lys Ala Phe Lys Arg Pro Gln Asp Leu Lys Lys His Val Lys Thr His
 130 135 140

Ala Asp Asp Ser Glu Ile Arg Ser Pro Glu Pro Gly Met Lys His Pro
 145 150 155 160

15 Asp Met Met Phe Pro Gln Asn Pro Arg Gly Ser Pro Ala Ala Thr His
 165 170 175

Tyr Phe Glu Ser Pro Ile Asn Gly Ile Asn Gly Gln Tyr Ser His Ala
 180 185 190

Pro Pro Pro Gln Tyr Tyr Gln Pro His Pro Pro Pro Gln Ala Pro Asn
 195 200 205

25 Pro His Ser Tyr Gly Asn Leu Tyr Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Gln Glu
 210 215 220

Gly Gly His Pro Tyr Asp Arg Lys Arg Gly Tyr Asp Ala Leu Asn Glu
 225 230 235 240

30 Phe Phe Gly Asp Leu Lys Arg Arg Gln Phe Asp Pro Asn Ser Tyr Ala
 245 250 255

Ala Val Gly Gln Arg Leu Leu Gly Leu Gln Ala Leu Gln Leu Pro Phe
 260 265 270

35

3

Leu Ser Gly Pro Ala Pro Glu Tyr Gln Gln Met Pro Ala Pro Val Ala
 275 280 285

Val Gly Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Ala Pro Gln Pro Pro
 5 290 295 300

Gly Tyr His Leu Pro Pro Met Ser Asn Val Arg Thr Lys Asn Asp Leu
 305 310 315 320

10 Ile Asn Ile Asp Gln Phe Leu Glu Gln Met Gln Asn Thr Ile Tyr Glu
 325 330 335

Ser Asp Glu Asn Val Ala Ala Ala Gly Val Ala Gln Pro Gly Ala His
 340 345 350

15 Tyr Val His Gly Gly Met Asn His Arg Thr Thr His Ser Pro Pro Thr
 355 360 365

His Ser Arg Gln Ala Thr Leu Leu Gln Leu Pro Ser Ala Pro Met Ala
 20 370 375 380

Ala Ala Thr Ala His Ser Pro Ser Val Gly Thr Pro Ala Leu Thr Pro
 385 390 395 400

25 Pro Ser Ser Ala Gln Ser Tyr Thr Ser Asn Arg Ser Pro Ile Ser Leu
 405 410 415

His Ser Ser Arg Val Ser Pro Pro His Glu Glu Ala Ala Pro Gly Met
 420 425 430

30 Tyr Pro Arg Leu Pro Ala Ala Ile Cys Ala Asp Ser Met Thr Ala Gly
 435 440 445

Tyr Pro Thr Ala Ser Gly Ala Ala Pro Pro Ser Thr Leu Ser Gly Ala
 35 450 455 460

4

Tyr Asp His Asp Asp Arg Arg Arg Tyr Thr Gly Gly Thr Leu Gln Arg
 465 470 475 480

5 Ala Arg Pro Ala Glu Arg Ala Ala Thr Glu Asp Arg Met Asp Ile Ser
 485 490 495

Gln Asp Ser Lys His Asp Gly Glu Arg Thr Pro Lys Ala Met His Ile
 500 505 510

10 Ser Ala Ser Leu Ile Asp Pro Ala Leu Ser Gly Thr Ser Ser Asp Pro
 515 520 525

Glu Gln Glu Ser Ala Lys Arg Thr Ala Ala Thr Ala Thr Glu Val Ala
 530 535 540

15 Glu Arg Asp Val Asn Val Ala Trp Val Glu Lys Val Arg Leu Leu Glu
 545 550 555 560

20 Asn Leu Arg Arg Leu Val Ser Gly Leu Leu Glu Ala Gly Ser Leu Thr
 565 570 575

Pro Glu Tyr Gly Val Gln Thr Ser Ser Ala Ser Pro Thr Pro Gly Leu
 580 585 590

25 Asp Ala Met Glu Gly Val Glu Thr Ala Ser Val Arg Ala Ala Ser Glu
 595 600 605

Gln Ala Arg Glu Glu Pro Lys Ser Glu Ser Glu Gly Val Phe Tyr Pro
 610 615 620

30 Thr Leu Arg Gly Val Asp Glu Asp Glu Asp Gly Asp Ser Lys Met Pro
 625 630 635 640

Glu

35

<210> 2

5

<211> 1446

<212> ADN

<213> *Penicillium chrysogenum*

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1446)

<400> 2

10 atg acg gag aac cac acc cct tct act acg cag ccg acg ttg cct gcg
48

Met Thr Glu Asn His Thr Pro Ser Thr Thr Gln Pro Thr Leu Pro Ala
1 5 10 15

15 cct gtt gct gaa gcc gcg ccg atc caa gca aac ccg gct cct tct gcc
96

Pro Val Ala Glu Ala Ala Pro Ile Gln Ala Asn Pro Ala Pro Ser Ala
20 25 30

20 tca gtc acg gcg act gct gct act gcg gcg gtg aac aac gcc ccc tct
144

Ser Val Thr Ala Thr Ala Ala Thr Ala Ala Val Asn Asn Ala Pro Ser
35 40 45

25 atg aac ggc gcc ggt gag cag ttg cct tgc cag tgg gtt ggt tgc acg
192

Met Asn Gly Ala Gly Glu Gln Leu Pro Cys Gln Trp Val Gly Cys Thr
50 55 60

30 gag aag tcc ccc act gcc gag tct cta tat gag cat gtt tgc gag cgt
240

Glu Lys Ser Pro Thr Ala Glu Ser Leu Tyr Glu His Val Cys Glu Arg
65 70 75 80

35 cat gtt gga cgt aaa agc acc aac aac ctc aac ctg acc tgc cag tgg
288

6

His Val Gly Arg Lys Ser Thr Asn Asn Leu Asn Leu Thr Cys Gln Trp
85 90 95

ggc act tgc aac acc aca aca gtc aag cgt gat cat atc acc tcc cac
5 336

Gly Thr Cys Asn Thr Thr Thr Val Lys Arg Asp His Ile Thr Ser His
100 105 110

atc cgc gtt cat gtg cca ctt aag ccg cac aaa tgc gac ttt tgt ggt
10 384

Ile Arg Val His Val Pro Leu Lys Pro His Lys Cys Asp Phe Cys Gly
115 120 125

15 432 aag gct ttc aag cgc ccc cag gat ttg aag aag cat gtc aag act cat

Lys Ala Phe Lys Arg Pro Gln Asp Leu Lys Lys His Val Lys Thr His
130 135 140

gcg gac gac tcc gag atc cgc tcc ccc gaa ccg ggc atg aag cac cct
20 480

Ala Asp Asp Ser Glu Ile Arg Ser Pro Glu Pro Gly Met Lys His Pro
145 150 155 160

gat atg atg ttc ccc caa aac cct agg ggt tcc cct gct gcc aca cat
25 528

Asp Met Met Phe Pro Gln Asn Pro Arg Gly Ser Pro Ala Ala Thr His
165 170 175

30 tac ttc gaa agc cct atc aac ggc atc aat ggg caa tat tca cat gca
576

Tyr Phe Glu Ser Pro Ile Asn Gly Ile Asn Gly Gln Tyr Ser His Ala
180 185 190

ccg cct ccc cag tac tac cag cca cac ccc cca ccc cag gct ccc aac
35 624

Pro Pro Pro Gln Tyr Tyr Gln Pro His Pro Pro Pro Gln Ala Pro Asn

	195	200	205
	ccg cat tcc tac ggc aat cta tac tat gcc ctg agc caa gga caa gag 672		
5	Pro His Ser Tyr Gly Asn Leu Tyr Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Gln Glu 210	215	220
	gga ggc cac ccc tac gac cgt aag cgc gga tat gac gcg ttg aac gaa 720		
10	Gly Gly His Pro Tyr Asp Arg Lys Arg Gly Tyr Asp Ala Leu Asn Glu 225	230	235 240
	ttt ttt ggc gac ttg aag cgc cgc cag ttc gac cct aat tcc tat gcc 768		
15	Phe Phe Gly Asp Leu Lys Arg Arg Gln Phe Asp Pro Asn Ser Tyr Ala 245	250	255
	gcg gtc ggc cag cgt ctg ctg ggt ctc cag gcc ctt cag ctt ccc ttc 816		
20	Ala Val Gly Gln Arg Leu Leu Gly Leu Gln Ala Leu Gln Leu Pro Phe 260	265	270
	ctc agt ggc cct gcc ccc gaa tac cag caa atg cct gcg cct gtt gcc 864		
25	Leu Ser Gly Pro Ala Pro Glu Tyr Gln Gln Met Pro Ala Pro Val Ala 275	280	285
	gtt ggc ggc ggc ggt ggt ggt tat ggc ggt ggt gct ccc cag cct cct 912		
30	Val Gly Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Ala Pro Gln Pro Pro 290	295	300
	ggt tac cac ctg ccc ccc atg tcc aat gtt cgg act aag aac gat ttg 960		
35	Gly Tyr His Leu Pro Pro Met Ser Asn Val Arg Thr Lys Asn Asp Leu 305	310	315 320

atc aac att gat cag ttc ctc gaa caa atg cag aac act atc tac gag
 1008
 Ile Asn Ile Asp Gln Phe Leu Glu Gln Met Gln Asn Thr Ile Tyr Glu
 5 325 330 335
 agc gat gag aat gtg gct gct gcc ggt gtt gcc cag ccc ggc gcg cat
 1056
 Ser Asp Glu Asn Val Ala Ala Ala Gly Val Ala Gln Pro Gly Ala His
 10 340 345 350
 tac gtg cac ggt ggc atg aat cat cgc acc acc cac tct ccc cca acc
 1104
 Tyr Val His Gly Gly Met Asn His Arg Thr Thr His Ser Pro Pro Thr
 15 355 360 365
 cac tcc cgc caa gcc acg tta ctg caa cta cct tca gcc ccc atg gcg
 1152
 His Ser Arg Gln Ala Thr Leu Leu Gln Leu Pro Ser Ala Pro Met Ala
 20 370 375 380
 gct gct aca gcg cac tcc cca tcg gtc ggc acc cca gcc ctg acc cca
 1200
 Ala Ala Thr Ala His Ser Pro Ser Val Gly Thr Pro Ala Leu Thr Pro
 25 385 390 395 400
 cct tcc agc gca cag tcg tat acc tcc aac cgc tct ccc atc tcc ctg
 1248
 Pro Ser Ser Ala Gln Ser Tyr Thr Ser Asn Arg Ser Pro Ile Ser Leu
 30 405 410 415
 cac agc tca cgc gtg tcg ccc cct cac gag gag gcg gcg ccg ggt atg
 1296
 His Ser Ser Arg Val Ser Pro Pro His Glu Glu Ala Ala Pro Gly Met
 35 420 425 430

9

tac cct cgc ttg cct gcg gcc atc tgc gcc gac agc atg act gca ggc
1344

Tyr Pro Arg Leu Pro Ala Ala Ile Cys Ala Asp Ser Met Thr Ala Gly
435 440 445

5

tat ccg acc gcc tca ggt gcc gca cca ccc tct act ctg agc ggt gcg
1392

Tyr Pro Thr Ala Ser Gly Ala Ala Pro Pro Ser Thr Leu Ser Gly Ala
450 455 460

10

tat gac cac gat gac cgc cgc cgc tac act ggt ggt acc caa ttc gcc
1440

Tyr Asp His Asp Asp Arg Arg Arg Tyr Thr Gly Gly Thr Gln Phe Ala
465 470 475 480

15

cta tag
1446
Leu

20

<210> 3
<211> 481
<212> PRT
<213> *Penicillium chrysogenum*

25

<400> 3
Met Thr Glu Asn His Thr Pro Ser Thr Thr Gln Pro Thr Leu Pro Ala
1 5 10 15

Pro Val Ala Glu Ala Ala Pro Ile Gln Ala Asn Pro Ala Pro Ser Ala
30 20 25 30

30

Ser Val Thr Ala Thr Ala Ala Thr Ala Ala Val Asn Asn Ala Pro Ser
35 40 45

35

Met Asn Gly Ala Gly Glu Gln Leu Pro Cys Gln Trp Val Gly Cys Thr
50 55 60

10

Glu Lys Ser Pro Thr Ala Glu Ser Leu Tyr Glu His Val Cys Glu Arg
 65 70 75 80

5 His Val Gly Arg Lys Ser Thr Asn Asn Leu Asn Leu Thr Cys Gln Trp
 85 90 95

Gly Thr Cys Asn Thr Thr Thr Val Lys Arg Asp His Ile Thr Ser His
 100 105 110

10 Ile Arg Val His Val Pro Leu Lys Pro His Lys Cys Asp Phe Cys Gly
 115 120 125

Lys Ala Phe Lys Arg Pro Gln Asp Leu Lys Lys His Val Lys Thr His
 15 130 135 140

Ala Asp Asp Ser Glu Ile Arg Ser Pro Glu Pro Gly Met Lys His Pro
 145 150 155 160

20 Asp Met Met Phe Pro Gln Asn Pro Arg Gly Ser Pro Ala Ala Thr His
 165 170 175

Tyr Phe Glu Ser Pro Ile Asn Gly Ile Asn Gly Gln Tyr Ser His Ala
 180 185 190

25 Pro Pro Pro Gln Tyr Tyr Gln Pro His Pro Pro Pro Gln Ala Pro Asn
 195 200 205

Pro His Ser Tyr Gly Asn Leu Tyr Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Gln Glu
 30 210 215 220

Gly Gly His Pro Tyr Asp Arg Lys Arg Gly Tyr Asp Ala Leu Asn Glu
 225 230 235 240

35 Phe Phe Gly Asp Leu Lys Arg Arg Gln Phe Asp Pro Asn Ser Tyr Ala
 245 250 255

Ala Val Gly Gln Arg Leu Leu Gly Leu Gln Ala Leu Gln Leu Pro Phe
260 265 270

5 Leu Ser Gly Pro Ala Pro Glu Tyr Gln Gln Met Pro Ala Pro Val Ala
275 280 285

Val Gly Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Ala Pro Gln Pro Pro
290 295 300

10 Gly Tyr His Leu Pro Pro Met Ser Asn Val Arg Thr Lys Asn Asp Leu
305 310 315 320

Ile Asn Ile Asp Gln Phe Leu Glu Gln Met Gln Asn Thr Ile Tyr Glu
15 325 330 335

Ser Asp Glu Asn Val Ala Ala Ala Gly Val Ala Gln Pro Gly Ala His
340 345 350

20 Tyr Val His Gly Gly Met Asn His Arg Thr Thr His Ser Pro Pro Thr
355 360 365

His Ser Arg Gln Ala Thr Leu Leu Gln Leu Pro Ser Ala Pro Met Ala
370 375 380

25 Ala Ala Thr Ala His Ser Pro Ser Val Gly Thr Pro Ala Leu Thr Pro
385 390 395 400

Pro Ser Ser Ala Gln Ser Tyr Thr Ser Asn Arg Ser Pro Ile Ser Leu
30 405 410 415

His Ser Ser Arg Val Ser Pro Pro His Glu Glu Ala Ala Pro Gly Met
420 425 430

35 Tyr Pro Arg Leu Pro Ala Ala Ile Cys Ala Asp Ser Met Thr Ala Gly
435 440 445

Tyr Pro Thr Ala Ser Gly Ala Ala Pro Pro Ser Thr Leu Ser Gly Ala
450 455 460

5 Tyr Asp His Asp Asp Arg Arg Arg Tyr Thr Gly Gly Thr Gln Phe Ala
465 470 475 480

Leu

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 00/ 00464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER ⁶:

IPC7 C12N 1/15, 15/80, C07K 14/385, C12P 37/00, C12R 1/66, 1/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, CIBEPAT, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	WO 0046375 A (NOVO NORDISK BIOTECH INC.) 10 August 2000 (10.08.2000) pages 3-7; claim 22.	1-7, 23-26, 28-29
X	WO 9925735 A (MICROBIA INC.) 27 May 1999 (27.05.1999) page 3-4; page 6, pages 8-9, pages 12 line 25, pages 14-15, page 18 example; claims 3, 5 and 7.	20, 22
Y	ES 2094088 A (ANTIBIÒTICOS S.A.) 1 January 1997 (01.01.1997) page 2, page 3, lines 25-47; pages 13-14.	1-9, 11-14, 18-19, 28-29
Y	M. A. PEÑALVA et al. The optimizacìon of pencyllin biosynthesis in fungi Tibitech, November 1998, volume 16, pages 483-489. Cited in the application.	1-9, 11-14, 18-19, 23-26, 28-29



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I." document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report
28 March 2001 (28.03.01)

Name and mailing address of the ISA/
SPTO

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 00/ 00464

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUAREZ, T., et al. Characterizacion of a <i>Penicillium chrysogenum</i> gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent pcbAB-pcbC promoter of the penicillin biosynthetic cluster. Molecular Microbiology (1996) 20 (3), pages 529-540 Cited in the application.	20
Y		8-9, 11-14, 18-19
Y	TILBURN, J. et al., The <i>Aspergillus</i> PacC zinc-finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline- expressed genes by ambient pH. The EMBO Journal (1995) volume 14, pages 779-790.	8-9, 11-14, 18-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 00/00464

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0046375	10.08.2000	AU 2755300	25.08.2000
WO 9925735	27.05.1999	AU 1797999	07.06.1999
		AU 1529099	07.06.1999
		EP 1032590	06.09.2000
		EP 1049797	08.11.2000
ES 2094088	01.01.1997		

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONALSolicitud internacional n°
PCT/ ES 00/00464**A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD**CIP⁷ C12N 1/15, 15/80, C07K 14/385, C12P 37/00, C12R 1/66, 1/82

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

WPI, CIBEPAT, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, STRAND

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
P, Y	WO 0046375 A (NOVO NORDISK BIOTECH INC.) 10.08.2000 páginas 3-7; reivindicación 22.	1-7, 23-26, 28-29
X	WO 9925735 A (MICROBIA INC.) 27.05.1999 páginas 3-4; página 6, páginas 8-9, páginas 12 línea 25, página 14-15, página 18 ejemplo; reivindicaciones 3,5 y 7.	20,22
Y		1-9, 11-14, 18-19, 28-29
Y	ES 2094088 A (ANTIBIÓTICOS S.A.) 01.01.1997 página 2, página 3, líneas 25 - 47; páginas 13-14.	1-7, 23-26, 28-29
Y	M.A. PEÑALVA et al. The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. Tibitech, noviembre 1998, volumen 16, páginas 483-489. Citado en la solicitud.	1-9, 11-14, 18-19, 23-26, 28-29

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

28 MAR 2001 28. 03. 01

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304Funcionario autorizado
Marta Hernández Cuéllar

n° de teléfono + 34 91 349 55 45

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 00/00464

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	SUAREZ, T., et al. Characterization of a <i>Penicillium chrysogenum</i> gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent pcbAB-pcbC promoter of the penicillin biosynthetic cluster. <i>Molecular Microbiology</i> (1996) 20 (3), páginas 529-540 Citado en la solicitud.	20
Y		8-9, 11-14, 18-19
Y	TILBURN, J. et al., The <i>Aspergillus</i> PacC zinc-finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline- expressed genes by ambient pH. <i>The EMBO Journal</i> (1995) volumen 14, páginas 779-790.	8-9, 11-14, 18-19

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 00/00464

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0046375	10.08.2000	AU 2755300	25.08.2000
WO 9925735	27.05.1999	AU 1797999	07.06.1999
		AU 1529099	07.06.1999
		EP 1032590	06.09.2000
		EP 1049797	08.11.2000
ES 2094088	01.01.1997		